

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 758 569

②① N° d'enregistrement national : 97 00540

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 12 N 15/13, C 12 N 5/10, A 61 K 48/00 // C 12 N 15/86

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 20.01.97.

③③ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 24.07.98 Bulletin 98/30.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS ETABLIS  
PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.

⑦② Inventeur(s) : PIECHACZYK MARC et NOEL  
DANIELE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : BREESE MAJEROWICZ.

⑤④ MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT D'UN MAMMIFERE PAR TRANSFERT DE GENE  
D'ANTICORPS ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONCERNANT.

⑤⑦ L'invention concerne un matériel biologique pour la  
préparation de compositions pharmaceutiques destinées à  
traiter un mammifère par transfert de gène, comprenant,  
soit au moins une séquence d'acides nucléiques contenant  
un gène thérapeutique et se présentant sous une forme  
permettant le transfert in vivo dudit gène dans des cellules  
de mammifère, soit au moins une cellule de mammifère ne  
produisant pas naturellement des anticorps, génétique-  
ment modifiée in vitro par au moins une séquence d'acides  
nucléiques précédente, et se présentant sous une forme  
permettant son incorporation dans l'organisme d'un mam-  
mifère ainsi qu'éventuellement sa culture préalable, carac-  
térisé en ce que ladite séquence d'acides nucléiques  
contient un gène d'anticorps et des éléments assurant l'ex-  
pression in vivo dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans  
la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thé-  
rapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment  
de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétique-  
ment modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et  
ne produisant pas naturellement des anticorps.

L'invention concerne aussi les compositions pharmaceu-  
tiques comprenant ce matériel biologique. §.

FR 2 758 569 - A1



MATÉRIEL BIOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT D'UN  
MAMMIFÈRE PAR TRANSFERT DE GÈNE D'ANTICORPS ET  
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT.

5                    La présente invention concerne le domaine de  
la thérapie génique consistant à transférer dans les  
cellules d'un sujet au moins un gène codant pour une  
protéine thérapeutique. Plus particulièrement,  
l'invention concerne le transfert, dans des cellules ne  
10                   produisant pas naturellement des anticorps, de séquences  
d'acide nucléique codant pour tout ou partie ou dérivé  
d'anticorps thérapeutiques impliquant une composante  
protéique participant à l'effet thérapeutique, de sorte  
que les cellules génétiquement modifiées par ces  
15                   séquences d'acide nucléique et implantées chez un sujet  
produisent et sécrètent dans la circulation sanguine  
dudit sujet une quantité thérapeutiquement efficace de  
cet anticorps.

                  La thérapie génique consiste à corriger la  
20                   déficience d'un gène en introduisant, dans les cellules  
où la déficience dudit gène est cause d'une pathologie,  
une séquence d'ADN portant l'information génétique  
permettant de remédier la déficiente. Les perspectives  
d'application de la thérapie génique dans le domaine des  
25                   maladies génétiques sont nombreuses et l'on peut citer  
par exemple les corrections des thalassemies, de la  
drépanocytose, des déficits du métabolisme hépatique, de  
la mucoviscidose, des myopathies, etc ... (W. F.  
Anderson, 256, 808, 1992 ; R. C. Mulligan, Science,  
30                   260, 926, 1993 ; D. Miller, Nature, 357, 455, 1992 ; R.  
Morgan et W. F. Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62, 191,  
1993 ; B. Dodet, Biofutur, Mai 1992).

                  Mais la thérapie génique permet aussi de  
lutter contre des maladies qui ne relèvent pas  
35                   exclusivement d'une déficience génétique, tels que des

cancers ou des infections virales, en introduisant dans les cellules de l'organe ou du tissu atteint un gène codant pour une protéine ou un ARN thérapeutique. De telles substances thérapeutiques sont par exemple des cytokines, des anticorps intracellulaire, des variants de protéines virales, des ARNs antisens, des ribozymes, etc ....

Les techniques permettant l'introduction de l'information génétique dans des cellules sont décrites dans la littérature. Deux approches principales peuvent cependant être envisagées.

La première consistant à introduire la séquence d'ADN portant l'information génétique directement *in vivo* dans les cellules des organes ou tissus cibles de la thérapie ou dans des cellules d'organes ou de tissus chargés de produire la substance thérapeutique, soit au voisinage du lieu de production, soit de façon systémique.

La seconde, relevant de la thérapie cellulaire et dite *ex vivo*, consiste à prélever des cellules d'un sujet, à modifier ces cellules *in vitro* en y introduisant la séquence d'ADN portant l'information génétique que l'on souhaite transférer, puis à réintroduire les cellules ainsi modifiées dans l'organisme du sujet. Cette stratégie thérapeutique est par exemple décrite dans le brevet américain No. 5 399 346.

Les séquences d'ADN portant l'information génétique que l'on souhaite introduire dans les cellules sont associés fonctionnellement à des séquences d'ADN permettant leur expression *in vivo* et peuvent se présenter sous plusieurs formes :

- Dans le cas d'un transfert de gène directement *in vivo* selon la première approche envisagée ci-dessus, elles peuvent être utilisées sous forme :

. libre, c'est à dire transférées sous forme d'ADN nu, comme un plasmide ou un fragment de restriction, notamment par injection *in vivo* dans les cellules, comme décrit dans la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 90 11 092;

. complexée ou associée à d'autres molécules favorisant leur entrée dans les cellules eucaryotes comme la lipofectin, le transfectace, le transfectam, la polyéthylènimine, etc ...;

. incorporée dans un vecteur viral, lequel sera introduit directement *in vivo* dans les cellules de l'organe ou du tissu cible par infection.

- Dans le cas d'un transfert de gène selon la seconde approche envisagée précédemment, dite *ex vivo*, la séquence d'ADN est intégrée *in vitro* dans des cellules qui sont ensuite introduites dans l'organisme du sujet; il peut s'agir alors par exemple de cellules souches hématopoïétique, de lymphocytes T, d'hépatocytes etc... Dans ce cas, les cellules génétiquement modifiées *in vitro* par la séquence d'ADN, selon les techniques décrites ci-dessus pour une introduction directement *in vivo*, peuvent avoir été prélevées du sujet traité ou provenir d'un autre sujet humain ou animal comme le porc (E. Cozzi et D. J. G. White, Nature Genetics, 1, 964-966, 1995).

Parmi, les substances capables d'interférer avec une pathologie et que l'on cherche à produire dans l'organisme du patient pour une thérapie génique, on peut citer certains antigènes ou anticorps.

L'expression de séquences d'ADN codant pour des protéines antigéniques vise à permettre la production, par les cellules génétiquement modifiées par cet ADN, d'antigène susceptibles d'induire une immunisation de l'individu. Une telle stratégie de vaccination a par exemple été mise en oeuvre dans le cas

de divers pathogènes dont le virus de la grippe (Tang, D., De Vit, M., et Johnston, Nature, 356, 152-154, 1992).

5 La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps tels que des anticorps chimériques, par génie génétique dans des cellules eucaryotes a également déjà été décrite, par exemple dans les brevets européens publiés sous les numéros 120 694 et 125 023. L'injection à des patients  
10 d'anticorps thérapeutiques vise à cibler des antigènes impliqués dans une pathologie afin de neutraliser soit directement, soit par le biais d'une cascade d'événements métaboliques ou immunitaires, l'un des agents causals de la maladie. On peut citer comme  
15 exemples de telles stratégies thérapeutiques, le traitement ou la prévention de lymphomes B (Yefenof, E., Picker, L. I., Scheuermann, R. N., Vitetta, E. S., Street, N. E., Tucker, T., Uhr, J. W., Current Opinion in Immunology, 5, 740-744, 1993).

20 La demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 94 29 446 décrit l'expression intracellulaire de séquences d'ADN codant pour des anticorps. Cette approche permet d'envisager une  
25 thérapie génique directement *in vivo* de pathologie impliquant des composants cellulaires non accessibles par les méthodes de vaccination traditionnelles ou fondée sur la production *in vivo* d'antigènes recombinants. Les séquences d'ADN exprimées par les  
30 cellules génétiquement modifiées selon la méthode décrite dans la demande de brevet internationale WO 94 29 446 sont donc essentiellement caractérisées par le fait qu'elles comprennent un gène d'anticorps modifié de façon à ce que l'anticorps ne soit pas sécrété.

35 La présente invention vise au contraire à réaliser l'expression *in vivo* de gènes d'anticorps par

des cellules qui sécréteront lesdits anticorps dans la circulation sanguine du mammifère porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène d'anticorps.

5 Cette invention est fondée sur la mise en évidence que divers types cellulaires, autres que ceux produisant naturellement des anticorps sont capables, après modification génétique, de produire de manière stable *in vivo* des anticorps.

10 En effet, les plasmocytes, qui sont les cellules spécialisées pour la production d'anticorps, constituent de mauvais candidats pour la production à long terme d'anticorps thérapeutiques par transfert de gènes; les plasmocytes ont une durée de vie réduite, de l'ordre de quelques jours, et le fait qu'ils produisent  
15 déjà un autre anticorps est de nature à conduire à des associations ou des recombinaisons entre les chaînes de l'anticorps naturellement produit et l'anticorps exprimé par le gène transféré, ce qui est hautement préjudiciable à l'effet thérapeutique recherché. Il  
20 était donc important de montrer que des types cellulaires non spécialisés pour la production naturelle d'anticorps étaient susceptibles d'accepter un transfert de gène, d'exprimer *in vivo* un anticorps thérapeutique et de sécréter des niveaux soutenus avantageusement  
25 régulés d'anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère.

En conséquence, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un  
30 mammifère par transfert de gène, comprenant :

- soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène thérapeutique et se présentant sous une forme permettant le transfert *in vivo* dudit gène dans des cellules de mammifère,

- soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps, génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente, et se présentant sous une forme permettant son implantation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement sa culture préalable,

ledit matériel biologique étant caractérisé par le fait que ladite séquence d'acide nucléique contient un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps.

Par séquence d'acides nucléiques, on entend aussi bien des séquences d'ADN ou d'ARN ou des séquences contenant des nucléotides modifiés.

La séquence d'acides nucléiques entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention comprend :

- au moins un gène d'anticorps thérapeutique, c'est à dire un gène codant pour un anticorps natif non modifié donc naturel, ou un fragment d'anticorps, tels que les fragments Fab ou F(ab)'<sub>2</sub> ou les fragments ScFv, ou encore un dérivé d'anticorps comme un anticorps chimérique ou un anticorps ou fragment d'anticorps fusionné à une substance effectrice par exemple une toxine ou une hormone;

- au moins un élément assurant l'expression du gène précédent; il s'agit de séquences promotrices de la transcription placées en amont du gène d'anticorps et

contrôlant son expression dans les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps.

Outre le gène d'anticorps et son promoteur, la séquence d'acides nucléiques peut comprendre une  
5 séquence de terminaison de la transcription, située en aval du gène d'anticorps et permettant la sécrétion du produit du gène d'anticorps dans la circulation sanguine du mammifère dont des cellules ont été génétiquement modifiées par la séquence d'acides nucléiques.

10 Le promoteur utilisé peut être tout promoteur permettant une expression efficace du gène qu'il contrôle dans le type cellulaire génétiquement modifié par la séquence d'acides nucléiques. Il peut ainsi être un promoteur viral, un promoteur ubiquitaire  
15 ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique.

Selon une première forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence  
20 d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des  
25 cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence se présentant sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN nue. On entend plus particulièrement par séquence d'ADN  
30 nu un plasmide, mais il peut aussi s'agir de tout autre forme d'ADN tel qu'un fragment de restriction. Une composition pharmaceutique à base de ce matériel biologique peut être administrée à un individu par injection ou électroporation localisée; elle contient  
35 alors outre, la ou les séquences d'acide nucléique du matériel biologique, un véhicule ou adjuvant



pharmaceutiquement acceptable et compatible avec des acides nucléiques.

5 Selon une deuxième forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des  
10 cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence étant complexée ou conjuguée à une molécule ou substance porteuse favorisant sa pénétration dans les cellules  
15 cibles, comme des liposomes ou des vésicules lipidiques.

Selon une troisième forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps  
20 et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par  
25 ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence se présentant sous la forme d'un vecteur de transfert. Le vecteur dans lequel est incorporé le gène d'anticorps peut être un vecteur viral biologique, comme un  
30 rétrovirus, un adénovirus, un parvovirus ou tout autre vecteur permettant le transfert efficace *in vivo* du gène d'anticorps dans les cellules d'un mammifère. Une composition pharmaceutique à base de ce matériel biologique peut être administrée à un individu soit  
35 localement soit par voie systémique selon les méthodes

classiques de transfert de gène, par transfection d'ADN ou d'ARN ou infection par un virus.

Un quatrième mode de réalisation de l'invention relève d'une stratégie de transfert de gène par thérapie cellulaire mettant en œuvre des cellules génétiquement modifiées. Dans ce mode de réalisation, le matériel biologique de l'invention est constitué de cellules ne produisent pas naturellement des anticorps, et se présentant sous une forme permettant leur incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, lesdites cellules étant génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

Le mode de réalisation précédent peut être mis en oeuvre selon deux variantes :

- Soit, les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention proviennent du mammifère à traiter. Dans cette variante, les cellules sont préparées par les techniques consacrées de la biologie cellulaire et moléculaire, comme par exemple, à partir de biopsies prélevées du patient à traiter, puis ces cellules sont modifiées génétiquement par la séquence d'acide nucléique portant le gène d'anticorps, soit par transfection soit par infection par un vecteur conforme à ceux décrits précédemment dans le cas d'un transfert de gène directement *in vivo*. Les compositions pharmaceutiques fabriquées à partir de ce matériel biologique sont administrées en retour au patient dont les cellules ont été prélevées.

- Soit, les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention proviennent d'un autre mammifère humain ou animal que celui à traiter.

5 Ces cellules ont été préparées comme dans la variante précédente. Dans le cas de cellules d'origine humaine, celles-ci proviennent de donneurs compatibles; dans le cas de cellules d'origine non-humaine, on utilise des cellules d'animaux génétiquement modifiées, comme le

10 porc, rendues compatibles pour une greffe d'organe.

Les cellules précédentes se présentent sous une forme permettant leur implantation par tout moyen connu dans l'organisme du mammifère receveur. Elles peuvent en outre se présenter sous une forme ayant

15 permis de les cultiver préalablement à la greffe. Il peut s'agir de tout support ou milieu de culture compatible avec leur administration et leur incorporation chez le receveur, comme par exemple une matrice du type de celle décrite dans la demande de brevet européen

20 publiée sous le numéro 378 576 concernant des fibroblastes.

Dans le quatrième mode de réalisation, mais aussi pour la préparation des acides nucléiques entrant

25 dans la composition des matériels biologiques des autres modes de réalisation de l'invention, on choisit des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps mais possédant :

- la capacité de pouvoir sécréter des

30 protéines dans la circulation sanguine d'un mammifère;

- une longue durée de vie dans l'organisme du mammifère, avantageusement d'au moins plusieurs mois à plusieurs années jusqu'à la vie entière du patient.

Plus particulièrement pour le quatrième mode

35 de réalisation de l'invention, ces cellules sont

choisies pour leur capacité à accepter facilement d'être prélevées, modifiées génétiquement ex vivo et implantées chez un mammifère.

Parmi les type cellulaires présentant les caractéristiques précédentes, l'invention envisage plus spécifiquement les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques.

Il a été démontré de manière surprenante (Fenjves, E. S., Smith, J., Zaradic, S., et Teichman, L. B., Human Gene Therapy, 5, 1241-1248, 1994) que les kératinocytes pouvaient produire relativement efficacement des protéines vers l'organisme et non pas seulement vers l'extérieur. En outre, leur culture est facile et en routine depuis plusieurs années dans les services hospitaliers pour les greffes de peau.

La manipulation des hépatocytes est plus difficile que celle des kératinocytes. Cependant, il a été montré (Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhart, J. F., Müller, D., Lupien, P. J., Wilson, J. M., Nature Genetics, 6, 335-341, 1994 ; Ferry, N., Duplessis, O., Houssin, D., Danos, O., Heard J-M., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 8377-8381, 1991) que les hépatocytes pouvaient être infectés par des rétrovirus recombinants à la fois ex vivo et in vivo.

La culture et la transduction rétrovirale des fibroblastes de peau sont faciles (Moullier, P., Maréchal, V., Danos, O., Heard, J-M., Transplantation, 56, 427-432, 1993). La manipulation des organoïdes est aisée (Moullier et al., Nature Genetics, 4, juin 1993, 154-159). Les fibroblastes présentent l'avantage d'être facilement prélevable chez un sujet par une simple opération chirurgicale. En outre, des protocoles de thérapie génique sont en préparation pour la correction de déficits lysosomiaux chez les enfants.

Les myoblastes qui sont des cellules musculaires non différenciées, peuvent aussi être purifiés, et seront vraisemblablement utilisés sans modification génétique dans le cadre du traitement de certaines maladies dégénératives (Yao, S-N., Smith, K. J., et Kurachi, K., Gene Therapy, 1, 99-107, 1994).

La modification génétique de cellules endothéliales a déjà été réalisée pour produire des protéines thérapeutiques, par exemple dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le numéro WO 90 06997. Les cellules endothéliales, qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins, sont donc particulièrement adaptées à la mise en oeuvre du matériel biologique de l'invention, dont le but est de faire sécréter, par les cellules génétiquement modifiées, les anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère.

D'autres types cellulaires peuvent être envisagés, telles que les cellules souches hématopoïétiques, dès lors qu'ils remplissent les caractéristiques définies plus haut.

Le matériel biologique de l'invention trouve son application dans la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir les rechutes de cancers, et les infections ou expansions virales plus particulièrement le SIDA.

Le cancer touche environ une personne sur quatre dans les populations occidentales et les traitements disponibles aujourd'hui ne sont réellement satisfaisants que pour un patient sur deux.

Des maladies virales graves touchent de manière de plus en plus importante les populations humaines, on pense bien entendu plus particulièrement aux virus HIV, pour lequel on ne dispose à l'heure

actuelle d'aucun traitement efficace pour prévenir ou traiter l'infection.

Le matériel biologique de l'invention est remarquable en ce qu'il permet d'envisager une nouvelle  
5 approche thérapeutique de ces maladies très graves.

En effet, dans le cas des cancers, il permet à l'organisme de disposer sur le long terme d'anticorps spécifiques des cellules tumorales soit cytocides, soit induisant la dormance cellulaire. Ce but est atteint en  
10 utilisant des séquences d'acide nucléique portant un gène codant pour des anticorps dirigés contre un antigène spécifique de cellules tumorales.

Dans le cas des infections virales, le matériel biologique de l'invention permet à l'organisme  
15 de maintenir sur le long terme un niveau basal d'anticorps soit neutralisants pour les virus, soit cytocides pour les cellules infectées. Ce but est atteint en utilisant des séquences d'ADN codant pour des anticorps dirigés contre un antigène spécifique du virus  
20 responsable de la dite infection ou contre un antigène spécifique des cellules infectées par ledit virus.

La présente invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que défini précédemment. Ces compositions  
25 peuvent contenir outre le matériel biologique de l'invention, des véhicules ou adjuvants classiquement utilisés. Les doses de matériel biologique entrant dans ces compositions pharmaceutiques sont adaptées au mode d'administration utilisée, à la pathologie visée, de la séquence d'acide nucléique mise en oeuvre et de sa forme  
30 de présentation, pour permettre la production et la sécrétion d'une quantité thérapeutiquement efficace de l'anticorps dans la circulation sanguine du sujet traité.

L'invention concerne aussi des cellules humaines ou non-humaines ne produisant pas naturellement des anticorps, mais génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps thérapeutique et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère ayant reçu lesdites cellules d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

Ces cellules constituent un matériel biologique particulièrement adapté pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à une thérapie cellulaire *ex vivo* d'un individu.

Les cellules humaines précédentes, dès lors qu'elles ne proviennent pas du patient chez lequel elles sont implantées, ou les cellules animales, sont bien entendu, préalablement à leur implantation, traitées par tous moyens physiques ou génétiques, connus de l'homme du métier, pour être protégées du système immunitaire du patient les recevant.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'un matériel biologique ou de cellules de précédents, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales. L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas

naturellement des anticorps, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène. Plus particulièrement, cette utilisation vise la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement des cancers ou d'infections virales.

L'invention concerne enfin un procédé de fabrication d'une cellule génétiquement modifiée par au moins une séquence d'ADN codant pour un anticorps thérapeutique ou un fragment de cet anticorps, caractérisée en ce que l'on transfère par tout moyen approprié des séquences d'ADN codant pour un anticorps thérapeutique ou un fragment de cet anticorps, dans des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'ADN.

Outre les caractéristiques qui précèdent, l'invention comporte d'autres caractéristiques qui apparaîtront au cours de la description qui suit et qui se réfèrent à des exemples expérimentaux de réalisation et de mise en oeuvre de la présente invention, étant entendu que ces exemples ne sauraient constituer une quelconque limitation à la portée des revendications.

Les travaux rapportés ci-dessous ont permis de démontrer que :

- *in vitro* des cellules prélevables chez le patient, modifiables génétiquement *ex vivo* et réimplantables, qui ne produisent pas naturellement des anticorps, sont capables de sécréter des anticorps recombinants conservant les propriétés de l'anticorps d'origine,



- au moins un type cellulaire précédent est capable de sécréter *in vivo* des anticorps recombinants conservant les propriétés de l'anticorps d'origine.

5                    I - Définition de l'anticorps recombinant.

10                    L'anticorps recombinant modèle utilisé pour les expériences de transfert de gène d'anticorps rapportées ci-après est un anticorps monoclonal de souris anti-thyroglobuline humaine (Tg10) (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). Son clonage moléculaire et la caractérisation fonctionnelle des ADN complémentaires de sa chaîne lourde et de sa chaîne légère ont été effectués comme indiqué ci-après.

15                    La thyroglobuline est une glycoprotéine iodée de haut poids moléculaire impliquée dans la synthèse, le stockage et la sécrétion des hormones thyroïdiques T3 et T4 (Marriq, C., C. Arnaud, M. Rolland, and S. Lissitzky. 1980. Eur. J. Biochem. 111:3347). Un anticorps monoclonal de souris, désigné ci-après Tg10, dirigé contre une région antigénique (région II) fréquemment reconnu par des autoanticorps naturels chez les patients atteints de maladie de Grave, 20 de la thyroïdite de Hashimoto et des carcinomes de la thyroïde, a été établi par des membres du laboratoire CNRS UMR 9921 de la Faculté de pharmacie de Montpellllier, Avenue Charles Flahaut, 34060, Montpellier Cedex 01, France (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). Les ADN complémentaires des chaînes légères (Kappa) et lourde (IgG1) de l'anticorps Tg10 ont été clonés dans le vecteur pSPORT1 (Gibco/BRL) par les techniques consacrées du génir génétique (Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory 25 30 35

Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). Les séquences nucléotidiques des parties variables des chaînes lourdes et légères qui spécifient chacune des chaînes d'anticorps ont été déterminées et sont représentées respectivement aux figures 1 et 2 en annexe. Le clonage et le séquençage des ADNc de l'anticorps Tg10 ont été effectués au laboratoire sus-mentionné.

Pour leur caractérisation fonctionnelle, les ADNc de la chaîne légère et de la chaîne lourde de l'anticorps Tg10 ont été clonés dans le vecteur rétroviral pLXPXSN (Morgan, R. A., L. Couture, O. Elroy-Stein, J. Ragheb, B. Moss, and W. F. Anderson. 1992. Nucl. Acids Res 20:1293-1299) soit de part et d'autre de la séquence IRES du poliovirus endogène à ce vecteur pour former les vecteurs PM130, soit individuellement en amont de la séquence IRES pour former les vecteurs PM117 et PM124, comme représenté à la figure 3 en annexe). Les cellules simiennes COS-7 (ATCC CRL 1651) ont ensuite été transfectées par la technique au phosphate de calcium soit par PM130 seul, soit par la combinaison PM117+PM124. La présence dans les surnageants de culture d'anticorps réactifs contre la thyroglobuline humaine a été testée par la technique ELISA (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). En outre, les constantes cinétiques d'association et de dissociation de l'anticorps recombinant Tg10 produit par les cellules COS-7 avec la thyroglobuline ont été déterminées à partir des surnageants de culture par résonance plasmonique de surface (Fagerstam, L. G., and R. Karlsson. 1993. Biosensor techniques. In Immunochemistry. V. Oss and M. vanRegenmortel, eds. M Dekker Inc. p.949-970) suivant la technique Biacore développée par la société Pharmacia Biosensor.

Les valeurs de ces constantes sont rapportées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Anticorps	Constante cinétique d'association $k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Constante cinétique de dissociation $k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	Constante d'affinité $K_a$
Anticorps Tg10 naturel	$4,6 \pm 0,1 \times 10^5$	$5,3 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \pm 0,4 \times 10^9$
Anticorps Tg10 recombinant (PM117+PM124)	$1,4 \pm 0,3 \times 10^5$	$4,3 \pm 1,0 \times 10^{-5}$	$3,2 \pm 1,4 \times 10^9$
Anticorps Tg10 recombinant (PM130)	$2,1 \pm 1,5 \times 10^5$	$6,0 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	$3,5 \pm 2,7 \times 10^9$
Chaîne lourde de l'anticorps Tg10 recombinant (PM117+PM124)	$1,0 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,0 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$3,3 \pm 1,2 \times 10^8$

De façon surprenante, le tableau 1 montre que la chaîne lourde synthétisée seule à partir de PM124 est sécrétée par les cellules COS-7 et reconnaît la thyroglobuline humaine avec une affinité diminuée seulement de 10 fois par rapport à l'anticorps complet.

## II - Lignées productrices de rétrovirus.

La plupart des cellules primaires sont extrêmement sensibles aux méthodes de transfection classiques. En outre, la durée de vie, et donc l'expression, de l'ADN transfecté est en général très courte dans la plupart des cellules transfectées.

Pour permettre une infection efficace de types cellulaires variés et une expression sur le long terme de l'anticorps Tg10 dans les cellules génétiquement modifiées, une lignée cellulaire productrice de rétrovirus recombinants véhiculant et exprimant les ADNc de l'anticorps Tg10 a été établie.

Les cellules d'emballage rétroviral amphotrope PA 317 (Miller, D. and Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) ont été transfectées par la technique du précipité au phosphate de calcium par le vecteur rétroviral PM130. Plusieurs clones producteurs stables ont été établis. La lignée PA130.10 a été utilisée pour les expériences d'infection ultérieures. Son titre en virus, dosé sur la lignée indicatrice NIH 3T3 (Miller, D. and Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) a été de  $10^4$  cfu/ml.

### III - Expériences in vitro.

Les rétrovirus produits par la lignée PA130.10 ont été utilisés pour infecter différentes lignées cellulaires établies représentatives de différents types cellulaires disponibles auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) :

- lignée NIH3T3 de fibroblastes murins;
- lignée A431 de kératinocytes humains;
- lignée HepG2 d'hépatocytes humains;
- lignée C2C12 de myoblastes.

Différents clones cellulaires ont été dérivés pour chaque type de transduction rétrovirale et l'anticorps Tg10 produit dans le surnageant de culture a été dosé par ELISA. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

Lignées	Anticorps Tg10
Lignée NIH3T3	88 +/- 65 ng / $10^5$ cellules / 24hrs
Lignée A431	35 +/- 6 ng / $10^5$ cellules / 24hrs
Lignée HepG2	3,5 +/- 1,5 ng / $10^5$ cellules / 24hrs
Lignée C2C12	2 +/- 0,6 ng / $10^5$ cellules / 24hrs

En outre, dans le cas des myoblastes C2C12 différenciés in vitro en myotubes la production est conservée.

Les propriétés thermodynamiques et cinétiques des anticorps produits par ces différents types cellulaires déterminées par résonance plasmonique de surface selon la technologie BIAcore (Pharmacia Biosensor) se sont révélées être identiques à celles de l'anticorps Tg10 de départ.

Les vecteurs rétroviraux ont dans un second temps été utilisés pour infecter des fibroblastes primaires de peau de souris (infection rétrovirale et des hépatocytes humains (transfection). Les productions en anticorps ont été respectivement de :

- 10 à 20 ng /  $10^5$  cellules / 3 jours, et de
- 1 à 10 ng /  $10^5$  cellules / 4 jours.

De même, les caractéristiques des anticorps produits ont été les mêmes que celles de l'anticorps de départ.

#### IV - Expérience in vivo.

Des cellules C2C12 modifiées génétiquement et qui ont conservé la capacité de se différencier en myotubes ont été implantées par injection dans les jambiers antérieurs de 4 souris syngéniques C3H à raison de  $10^7$  cellules par jambier.

Chez 3 des 4 souris, la production d'anticorps recombinants ayant conservé les propriétés thermodynamique et la propriété de reconnaissance de l'antigène de l'anticorps de départ a été suivie pendant deux mois. La quantité d'anticorps produite s'est régulièrement élevée du niveau de base à une production d'environ 100 ng/ml de sérum.

## REVENDECATIONS.

5 1) Matériel biologique pour la préparation  
de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un  
mammifère par transfert de gène, comprenant, soit au  
moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène  
thérapeutique et se présentant sous une forme permettant  
le transfert *in vivo* dudit gène dans des cellules de  
mammifère, soit au moins une cellule de mammifère ne  
10 produisant pas naturellement des anticorps,  
génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une  
séquence d'acide nucléique précédente, et se présentant  
sous une forme permettant son incorporation dans  
l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement sa  
15 culture préalable, caractérisé en ce que ladite séquence  
d'acides nucléiques contient un gène d'anticorps et des  
éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène  
d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine  
d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace  
20 de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des  
cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par  
ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas  
naturellement des anticorps.

25 2) Matériel biologique selon la  
revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une  
séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps  
et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène  
d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine  
30 d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace  
de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des  
cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par  
ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas  
naturellement des anticorps, ladite séquence se

présentant sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN nue.

5                   3) Matériel biologique selon la  
revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une  
séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps  
et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène  
d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine  
10 d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace  
de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des  
cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par  
ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas  
naturellement des anticorps, ladite séquence étant  
complexée ou conjuguée à une molécule ou substance  
15 porteuse.

20                   4) Matériel biologique selon la  
revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une  
séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps  
et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène  
d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine  
d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace  
de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des  
cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par  
25 ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas  
naturellement des anticorps, ladite séquence étant un  
vecteur permettant le transfert efficace *in vivo* du gène  
d'anticorps dans des cellules.

30                   5) Matériel biologique selon la  
revendication 4, caractérisé en ce que le vecteur est un  
vecteur viral biologique.

35                   6) Matériel biologique selon la  
revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué

de cellules ne produisent pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, lesdites cellules étant  
5 génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace  
10 de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

7) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, selon la revendication  
15 6, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps proviennent du mammifère à traiter.

8) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, selon la revendication  
20 6, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps proviennent d'un autre mammifère que celui à traiter et ont subi un traitement les rendant compatibles.  
25

9) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement  
30 des anticorps sont choisies parmi celles possédant :

- la capacité de pouvoir sécréter des protéines dans la circulation sanguine d'un mammifère;
- une longue durée de vie dans l'organisme d'un mammifère.



10) Matériel biologique selon la revendication 9, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps sont choisies parmi celles acceptant facilement d'être prélevées, modifiées génétiquement ex vivo et implantées chez un mammifère.

11) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps sont choisies parmi les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques.

12) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le gène d'anticorps est un gène codant pour un anticorps natif, un fragment ou un dérivé de cet anticorps tel qu'un anticorps chimérique.

13) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir un cancer chez un sujet, selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps est dirigé contre un antigène spécifique de cellules tumorales.

14) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir une infection ou une expansion virale chez un sujet, selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit anticorps fragment ou dérivé d'anticorps est dirigé contre un antigène spécifique du virus

responsable de la dite infection ou contre un antigène spécifique des cellules infectées par ledit virus.

5                   15) Composition pharmaceutique comprenant un matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 avantageusement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10                   16) Cellule humaine ou non ne produisant pas naturellement des anticorps, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps thérapeutique et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la  
15                   circulation sanguine d'un mammifère ayant reçu lesdites cellules d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

20                   17) Utilisation d'un matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou de cellules selon la revendication 16, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales.

25                   18) Utilisation d'une séquence d'acide nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet  
30                   anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un  
35                   mammifère par transfert de gène.

19) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales.

5

20) Procédé de fabrication d'une cellule selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'on transfère par tout moyen approprié au moins une séquence d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps dans des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique.

10

15

20

## PL. 1/3

Fig. 1

ATG GGT TGG CTG TGG AAC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GGA CAG  
 M G W L W N L L F L M A A A Q S A Q G Q  
 -20 -10 -1 1

ATC CAC TTG GTA CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC  
 I H L V Q S G P E L K K P G E T V K I S  
 10 20

TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA TCG TAT GGC TTG ACC TGG GTG ATA CAG TCT CCA  
 C K A S G Y T F T S Y G L T W V I Q S P  
 30 40

GGA AAG GAT TTA AAA TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TTC TCT GGA GTG CCA ACA TAT GCT  
 G K D L K W M G W I N T F S G V P T Y A  
 50 52 52A 60

GAT GAC TTC AAG GGA CGC TTT GCC TTC TCT TTG GAC ACC TCT ACC AGC ACT GCC TAT TTG  
 D D F K G R F A F S L D T S T S T A Y L  
 70 80

CAG ATC GAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT TCA AGA AGG CGG GGT  
 Q I D N L K N E D T A T Y F C S R R G G  
 82 82A 82B 82C 90 94

TTT ATT ACT ACG GCT CTT GAC ACC TGG GGC CAA GGC ACC TCT CTC ACA GTC TCC TCA GCC  
 F I T T A L D T W G Q G T S L T V S S A  
 100 110 113

## PL. 2/3

Fig. 2

ATG AAG TTG CCT GGT AGG CTG TTG GTG CTG ATG TTC TGG ATT CCT GCT TCC AAT AGT AAT  
 M K L P G R L L V L M F W I P A S N S N  
 -19 -10 -1 1

GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG TCT GTC AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC  
 V V M T Q T P L S L S V S L G D Q A S I  
 10 20

TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC ATT GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG TAC  
 S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y  
 27 27A 27B 27C 27D 27E

CTG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAT AAA GTT TCC AAC CGA TTG TCT  
 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R L S  
 40 50

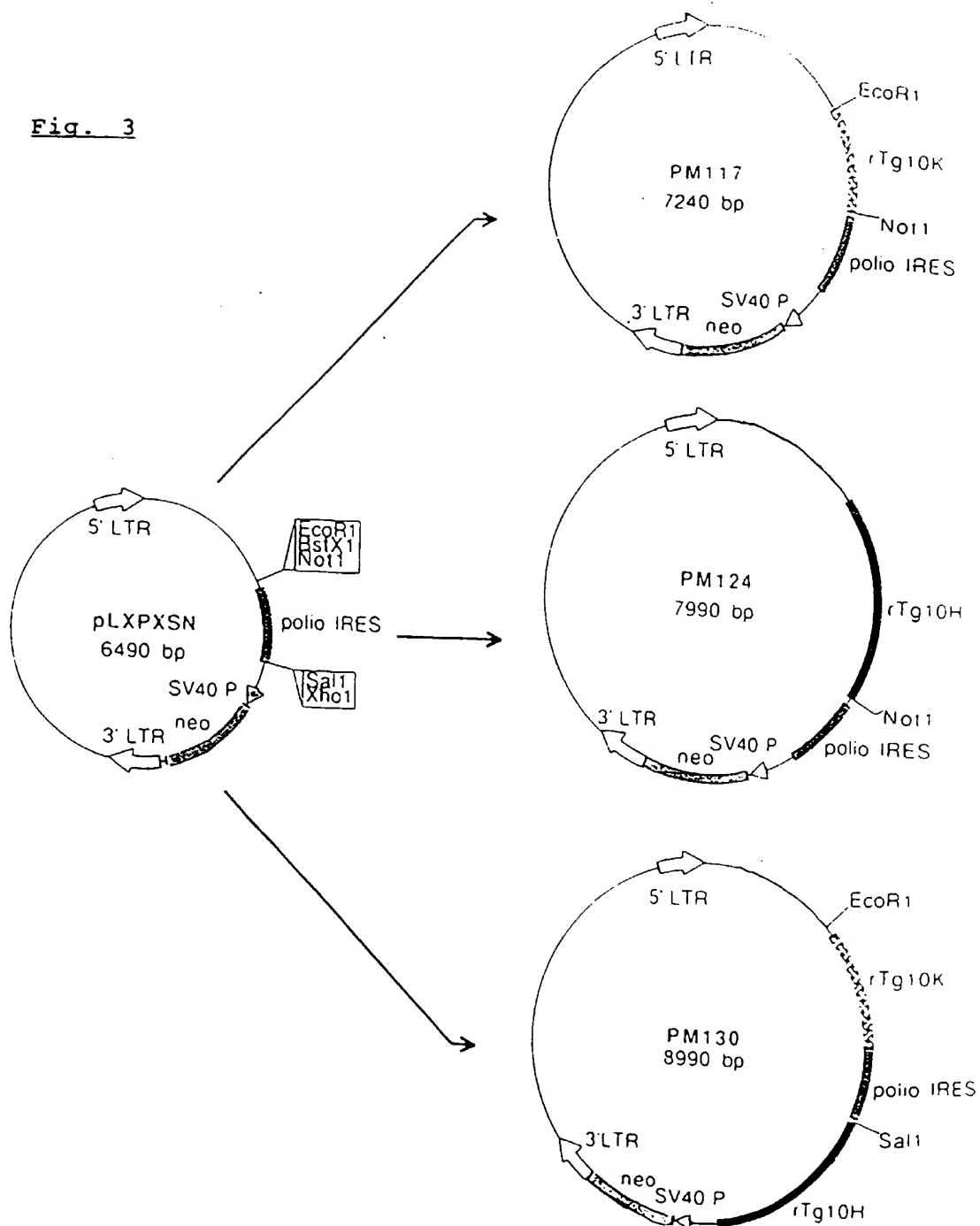
GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAC TTC ACA CTC AAA ATC AGC  
 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S  
 60 70

AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA CTT TAT TAC TGT TTT CAA GGT TCA CAT ATT CCA TTC  
 R V E A E D L G L Y Y C F Q G S H I P F  
 80 90

ACG TTC GGT TCG GGG ACA AAG TTC GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC  
 T F G S G T K L E I K R A D A A P T V S  
 100 110

## PL. 3/3

Fig. 3



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

FA 537845

FR 9700540

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

## **Documents considérés comme pertinents**

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	Domaines techniques recherchés (INT CL <sup>6</sup> )
X	WO 90 06997 A (U.S. GOVERNMENT) 28 Juin 1990 * exemple 1 * * revendications *	1-18	
D,A	E. FENJVES ET AL. : "Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes : Prospects for keratinocyte gene therapy." HUMAN GENE THERAPY, vol. 5, no. 10, octobre 1994, NEW YORK, NY, ETATS-UNIS, pages 1241-1248, XO002044923 * le document en entier *	1-18	
A	K. KATO ET AL. : "Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.93, no. 17, 20 Août 1996, WASHINGTON, DC, ETATS-UNIS pages 9085-9089, XP002044924 * abrégé *	1-18	A 61K C 07K
A	D. NOEL ET AL. : "Analysis of the individual contributions of immunoglobulin heavy and light chains to the binding of antigen using cell transfection and plasmon resonance analysis." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol.193, no.2, 21 Juin 1996, AMSTERDAM, PAYS BAS, pages 177-187, XP002044925 * abrégé * * figure 1 *	1-18	

.../...

Date : 29 Octobre 1997

Examineur : Nooij, F

### **CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES**

X : particulièrement pertinent à lui seul  
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  
O : divulgation non-écrite  
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention  
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou qu'à une date postérieure  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons  
.....  
& : membre de la même famille, document correspondant

REPUBLIQUE FRANCAISE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement national
FA 537845
FR 9700540

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

Documents considérés comme pertinents			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	Domaines techniques recherchés (INT CL <sup>6</sup> )
A	R. BEERI ET AL. : "Intracellular expression of single chain antibodies revers ErbB-2 transformation." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 39, 30 Septembre 1994, BALTIMORE, MD, ETATS-UNIS, pages 23931-23936, XP002044926 * abrégé *	1-18	
A	S. AGER ET AL. : "Retroviral display of antibody fragments; Interdomain spacing strongly influences vector infectivity." HUMAN GENE THERAPY, vol. 7, no. 17, 10 Novembre 1996, NEW YORK, NY, ETATS-UNIS, pages 2157-2164, XP002044927 * abrégé * * figure 4 *	1-18	
A	FR - 2 706 486 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 23 Décembre 1994 * exemples * * revendications *	1-18	
T	D. NOEL ET AL. : "In vitro and in vivo secretion of cloned antibodies by genetically modified myogenic cells." HUMAN GENE THERAPY, vol. 8, no. 10, 1 Juillet 1997, NEW YORK, NY, ETATS-UNIS, pages 1219-1229, XP002044928 * le document en entier *	1-18	
Date : 29 Octobre 1997		Examineur : Nooij, F	
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>  X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	